PCT ORGANIZACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL
Oficina Internacional
SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(51) Clasificación Internacional de Patentes 6 :		(11) Número de publicación internacional:
C07D 305/14, 407/12, A61K 49/00, 41/00	A1	WO 97/19938
		(43) Fecha de publicación internacional: 5 de Junio de 1997 (05.06.97)

(21) Solicitud internacional: PCT/ES96/00231

(22) Fecha de la presentación internacional: 29 de Noviembre de 1996 (29.11.96)

(30) Datos relativos a la prioridad:

P 9502361	29 de Noviembre de 1995 (29.11.95)	ES
P 9602522	29 de Noviembre de 1996 (29.11.96)	ES

(71) Solicitante *(para todos los Estados designados salvo US)*: CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACIONES CIENTIFICAS [ES/ES]; Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/solicitantes *(sólo US)*: AMAT GUERRI, Francisco [ES/ES]; Instituto Química Orgánica General, Consejo Superior Investigaciones Científicas, Juan de la Cierva, 3, E-28006 Madrid (ES). SOUTO, Andre [ES/ES]; Instituto Química Orgánica General, Consejo Superior Investigaciones Científicas, Juan de la Cierva, 3, E-28006 Madrid (ES). ACUNA FERNANDEZ, Alberto Ulises [ES/ES]; Instituto Química Física Rocasolano, Serrano, 119, E-28006 Madrid (ES). ANDREU MORALES, José Manuel [ES/ES]; Centro Investigaciones Biológicas, Velázquez, 144, E-28006 Madrid (ES). BARASOAIN BLASCO, Mª Isabel [ES/ES]; Centro Investigaciones Biológicas, Velázquez, 144, E-28006 Madrid (ES). ABAL, Miguel [ES/ES]; Centro Investigaciones Biológicas, Consejo Superior Investigaciones Científicas, Velázquez, 144, E-28006 Madrid (ES).

(74) Mandatario: OJEDA GARCIA, Pedro; Consejo Superior Investigaciones Científicas, Serrano, 113, E-28006 Madrid (ES).

(81) Estados designados: CA, JP, MX, NO, US, Patente europea (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Publicada
Con informe de búsqueda internacional.

(54) Title: FLUORESCENT DERIVATIVES OF PACLITAXEL AND DOCETAXEL WITH ANTINEOPLASTIC ACTIVITY, METHOD FOR PRODUCING THEM AND THEIR APPLICATIONS

(54) Título: DERIVADOS FLUORESCENTES DE PACLITAXEL Y DOCETAXEL CON ACTIVIDAD ANTINEOPLASICA, METODO PARA OBTENERLOS Y SUS APLICACIONES

(57) Abstract

Intensively fluorescent derivatives have been synthesized from a substance used at present as anticancer (chemotherapy) agent, against ovarian and mammal tumors, and other tumors. Said derivatives enable to visualize the cellular target of said drug, since the derivatization does not modify the biological activity. There is no existing compound which has the solubility, activity and fluorescence characteristics of the compounds disclosed in the present invention. Said derivatives may be used as fluorescence microscopy colorants specific to microtubules of the cytoskeleton in cells and other living organisms. Said derivatives have many applications in the analysis of the cell anatomy and in clinical diagnosis.

(57) Resumen

Se ha sintetizado derivados intensamente fluorescentes de una sustancia utilizada actualmente como anticancerígeno (quimioterapia), contra tumores de ovario y mama entre otros. Estos derivados permiten visualizar la diana celular de dicho fármaco, ya que la derivatización no ha modificado la actividad biológica. No existe ningún compuesto que presente las características de solubilidad, actividad y fluorescencia de los aquí descrito. Dichos derivados se pueden usar como colorantes de microscopía de fluorescencia específicos de los microtúbulos del citoesqueleto en células y otros organismos vivos. Estos derivados tienen múltiples aplicaciones en el análisis de la anatomía celular y en el diagnóstico clínico.

UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AM	Armenia	**GB**	Reino Unido	**MW**	Malawi
AT	Austria	**GE**	Georgia	**MX**	México
AU	Australia	**GN**	Guinea	**NE**	Níger
BB	Barbados	**GR**	Grecia	**NL**	Paises Bajos
BE	Bélgica	**HU**	Hungria	**NO**	Noruega
BF	Burkina Faso	**IE**	Irlanda	**NZ**	Nueva Zelandia
BG	Bulgaria	**IT**	Italia	**PL**	Polonia
BJ	Benin	**JP**	Japón	**PT**	Portugal
BR	Brasil	**KE**	Kenya	**RO**	Rumania
BY	Belarús	**KG**	Kirguistán	**RU**	Federación Rusa
CA	Canadá	**KP**	República Popular Democrática de Corea	**SD**	Sudán
CF	República Centroafricana			**SE**	Suecia
CG	Congo	**KR**	República de Corea	**SG**	Singapur
CH	Suiza	**KZ**	Kazajstán	**SI**	Eslovenia
CI	Côte d'Ivoire	**LI**	Liechtenstein	**SK**	Eslovaquia
CM	Camerún	**LK**	Sri Lanka	**SN**	Senegal
CN	China	**LR**	Liberia	**SZ**	Swazilandia
CS	Checoslovaquia	**LT**	Lituania	**TD**	Chad
CZ	República Checa	**LU**	Luxemburgo	**TG**	Togo
DE	Alemania	**LV**	Letonia	**TJ**	Tayikistán
DK	Dinamarca	**MC**	Mónaco	**TT**	Trinidad y Tabago
EE	Estonia	**MD**	República de Moldova	**UA**	Ucrania
ES	España	**MG**	Madagascar	**UG**	Uganda
FI	Finlandia	**ML**	Mali	**US**	Estados Unidos de América
FR	Francia	**MN**	Mongolia	**UZ**	Uzbekistán
GA	Gabón	**MR**	Mauritania	**VN**	Viet Nam

1. Título

Derivados fluorescentes de paclitaxel y docetaxel con actividad antineoplásica, método para obtenerlos y sus aplicaciones

2. Sector de la técnica

1) farmacéutico-bioquímico; 2) compuestos para el análisis de la diana celular de los fármacos anticancerosos paclitaxel y docetaxel, y para la terapia anticancerosa directa o fotodinámica.

3. Estado de la técnica

Paclitaxel (o taxol, marca registrada por Brystol-Myers Squibb), un diterpenoide natural que se extrae de la corteza del tejo del Pacífico, *Taxus brevifolia*, y su análogo de síntesis docetaxel (10-desacetil-3'-(N-desbenzoil)-3'-(N-tertbutiloxicarbonil)paclitaxel, o taxotere, marca registrada por Rhône-Poulenc) están actualmente entre las más prometedoras drogas anticancerosas debido a su capacidad para estabilizar los microtúbulos del citoesqueleto y, por consiguiente, para inhibir la división celular. Sin embargo, ambos fármacos presentan varios inconvenientes en su utilización en terapia humana, principalmente una solubilidad muy reducida en el plasma sanguíneo, así como varios efectos secundarios. Un buen número de laboratorios implicados en la lucha contra el cáncer dirigen actualmente su atención a la obtención de nuevos fármacos anticancerosos por modificación química de estas dos moléculas de taxanos, así como a la aclaración de su mecanismo de acción bioquímica. Algunos de los inventores de la presente patente han descrito las estructuras de los microtúbulos formados por la acción de paclitaxel (Andreu y cols., *J. Mol. Biol.* **1992**, *226*, 169 y *J. Biol. Chem.* **1994**, *50*, 31785), el ensamblaje de GDP-tubulina en presencia de taxoides y la relación entre la reacción de unión de paclitaxel y la de formación de microtúbulos (Díaz y cols., *Biochemistry* **1993**, *32*, 2747 y 10067).

Para los investigadores que estudian los microtúbulos celulares y el mecanismo de acción de estas drogas sería de inmediata utilidad disponer de un derivado luminiscente (ya que ni paclitaxel ni docetaxel lo son) que, además,

fuese suficientemente soluble en agua. Esto permitiría: a) el estudio directo *in vivo*, mediante microscopía de fluorescencia, de los microtúbulos diana en los cultivos celulares, y b) disponer de una poderosa herramienta para estudiar el mecanismo molecular del ensamblaje de los microtúbulos inducido por estos taxanos, y para descubrir otras posibles dianas de las drogas dentro de la célula. Por otra parte, la observación directa, de una manera sencilla, de las células en las que el taxano ha ejercido su efecto permitiría desarrollar nuevos métodos de análisis y de diagnóstico relacionados con el tratamiento de pacientes con estas drogas. Además, las especificas propiedades fotoquímicas de los colorantes se podrían utilizar como ruta adicional en la destrucción de la célula cancerosa.

Algunos derivados fluorescentes de ambos taxanos se han descrito ya en la bibliografía. Sin embargo, el éxito de su aplicación a los anteriores objetivos ha sido hasta ahora muy limitado. Se ha descrito un derivado de paclitaxel que posee un grupo dansilo en la posición 7, unido a través de un grupo de β-alanina como espaciador (Kingston, *Pharmac. Ther.* **1991**, *52*, 1), aunque la bioactividad de este compuesto está pendiente de demostración. También se ha dado cuenta de dos derivados fluorescentes de paclitaxel con grupos amino en su molécula: uno con un grupo *m*-amino en el benzoílo en posición 2 (Han y cols., *Mol. Biol. Cell* **1994**, *5*, 284a), pero el derivado es menos activo que la droga de la que procede, y otro con un grupo *m*-dimetilamino en el benzoílo en posición 3' (Sengupta y cols., *Biochemistry*, **1995**, *34*, 11889) cuya actividad biológica es similar a la de paclitaxel. La fluorescencia de estos dos aminoderivados es baja, aunque mayor que la del propio paclitaxel, y los valores de los coeficientes de extinción molar son pequeños. Esto hace que para su detección sea necesario utilizar altas concentraciones del derivado fluorescente. Cuando esto no es posible, dicha detección no se puede realizar. Asimismo se han descrito varios derivados fluorescentes de docetaxel con un grupo 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazo-4-ilo en la posición 7, o en la 3' de su derivado 3'-NH-desacilado, o bien con un grupo biotina en las posiciones 7, 10 o 3' (Dubois y cols., *Bioorg. Med. Chem.*, **1995**, *10*, 1357). En todos estos últimos compuestos los grupos fluorescentes están unidos al esqueleto de paclitaxel a través de un grupo 6-aminocaproico como espaciador. Sin embargo, sus actividades biológicas en células vivas parecen

discrepantes, y tiñen defectuosamente los microtúbulos celulares. Por último, existe comercialmente disponible (*Molecular Probes*, Holanda) un derivado de 3'-NH-desbenzoilpaclitaxel fluorescente (BODIPY-FL-Taxol, marca registrada) que posee un grupo de pirrometeno.BF_2 sustituido en el grupo NH en dicha posición 3', pero cuya solubilidad en agua es baja, lo que nuevamente limita considerablemente su empleo.

Una alternativa para visualizar el sistema de microtúbulos celulares consiste en utilizar las bien conocidas técnicas de inmunofluorescencia, por ejemplo mediante un anticuerpo fluorescente anti-tubulina. Estas técnicas, comercialmente disponibles, son indirectas, complejas y laboriosas, y permiten observar el sistema de microtúbulos sólo después de que éstos hayan interaccionado con el taxano. Obviamente, estas técnicas de inmunofluorescencia no podrían substituir a las basadas en una molécula de paclitaxel o docetaxel fluorescente, porque en aquellas los microtúbulos interaccionan con una proteína (IgG o sus fragmentos), y porque tanto la posición como la forma de actuación de dicha proteína y del taxano anticanceroso deben ser diferentes.

4. Descripción de la invención

4.1 La presente invención está basada en la obtención de derivados de los agentes anticancerosos paclitaxel y docetaxel que, además de conservar la bioactividad, emiten fluorescencia al ser excitados con luz visible. Esta propiedad permite, mediante microscopía de fluorescencia, detectar: a) las células que han reaccionado con la droga, y b) a qué parte de la célula se ha unido dicha droga. Los derivados de paclitaxel y de docetaxel cuya obtención y empleo aquí se patentan permiten además transportar al interior de la célula mayores concentraciones de la droga anticancerosa. Por otra parte, usando el mismo método de obtención, pueden unirse a la droga grupos moleculares que, al ser iluminados con luz visible, generen productos tóxicos para la célula.

4.2 Más concretamente, la invención describe la obtención y el empleo de derivados de paclitaxel o docetaxel que poseen un grupo cromóforo, unido al núcleo de la droga por la posición 7 a través de un espaciador. Es bien sabido que las modificaciones en el hidroxilo en esta posición 7 en la molécula de

paclitaxel no afectan apreciablemente a la actividad biológica de la droga. Los numerosos derivados aquí patentados se obtienen básicamente por un procedimiento químico que comprende dos pasos:

Primer paso: esterificación selectiva del grupo alcohólico en la posición 7 de la molécula de paclitaxel o docetaxel con ácidos carboxílicos que poseen en su molécula al menos un grupo amino primario libre. Esta reacción puede llevarse a cabo de diferentes modos, en general en varios pasos, siempre con aminoácidos con el grupo amino adecuadamente protegido, y con protección química adicional de los grupos del taxano que también puedan esterificarse. En la presente invención se ha usado preferentemente un procedimiento que comprende tres etapas, básicamente similares a las descritas por Mathew y cols en *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 145 para la esterificación en posición 7 de paclitaxel con L-alanina: 1) esterificación de los grupos alcohólicos en posiciones 7 y 2' de paclitaxel o docetaxel con un aminoácido con el grupo amino protegido (por ejemplo, con el grupo N-tertbutoxicarbonilo); 2) desprotección de ambos grupos amino en el diéster por reacción con ácido fórmico; y 3) hidrólisis acuosa selectiva del grupo éster en posición 2'. El aminoácido que se emplea para esterificar la posición 7 puede tener el grupo amino primario separado del carboxílico por una cadena de 1 a 18 carbonos, lineal o ramificada, o por un grupo fenileno, con o sin sustituyentes alquílicos, y puede ser cualquiera de los α-L-aminoácidos naturales conocidos, como glicina, alanina, prolina, etc, sus D-isómeros, las mezclas racémicas correspondientes, o cualquier compuesto que posea simultáneamente en su molécula los grupos ácido carboxílico y amino primario.

Segundo paso: unión covalente de un cromóforo luminiscente (fluorescente o fosforescente) a dicho grupo amino del derivado de paclitaxel o docetaxel obtenido en el primer paso, mediante reacción con una molécula de un colorante que posee un grupo con reacción selectiva con grupos amino. El grupo específico de la molécula de colorante que reacciona con el grupo amino del derivado de paclitaxel o docetaxel puede ser cualquiera de los que se conocen por su alta afinidad reactiva frente a aminas primarias, tales como isocianatos, isotiocianatos, succinimidilésteres, ácidos carboxílicos o sus haluros y ácidos sulfónicos o sus haluros. El colorante con el anterior grupo reactivo de aminas primarias es

siempre un derivado de otro colorante, elegido entre los de las familias de los colorantes fluorescentes: xantenos (fluoresceína, Floxina, Eosina, Eritrosina, Rosa de Bengala, etc), tiacinas (tionina, Azul de Metileno, Azure A, Azure B, etc), rodaminas (Rodamina B, Rodamina 3B, Rodamina 19, Rodamina 6G, Rodamina 101, Rodamina 123, etc), cumarinas, porfirinas, aminonaftalenos, hidrocarburos policíclicos, polienos, y complejos de pirrometenos con trifluoruro de boro, que se unen al derivado de paclitaxel o docetaxel por el grupo amino libre existente en el sustituyente en la posición 7 de la droga.

Las únicas limitaciones de las anteriores reacciones de esterificación en posición 7 con un aminoácido y posterior sustitución del grupo amino del derivado de paclitaxel o docetaxel con un resto de colorante son:

1) las reacciones no deben alterar la estructura molecular del núcleo de paclitaxel o docetaxel, excepto en lo que se refiere a la esterificación de su posición 7, ni la del núcleo cromofórico del colorante;

2) las propiedades biológicas del derivado luminiscente de paclitaxel o docetaxel deben ser idénticas, o muy similares, a las del correspondiente taxano sin sustituir;

3) las propiedades de absorción y emisión de luz del cromóforo unido a la molécula de paclitaxel deben ser muy similares a las del colorante correspondiente en estado libre;

4) las propiedades de solubilidad en agua del derivado de paclitaxel o docetaxel finalmente obtenido deben ser tales que permitan su rápido paso a través de la membrana celular, si como su fácil disolución en el medio acuoso citoplasmático.

Una interesante aplicación de todos estos derivados es el empleo como fotosensibilizadores para la terapia fotodinámica anticancerosa, especialmente los derivados que llevan incorporados cromóforos que poseen altos rendimientos cuánticos en la generación de la especia activa oxígeno molecular singlete. Esta aplicación está basada en la capacidad de paclitaxel y docetaxel para atravesar la membrana celular y unirse a la tubulina y a los microtúbulos del citoesqueleto. La célula así marcada puede ser irradiada con luz visible, que sería absorbida por el cromóforo unido al taxano, dando lugar a la generación de oxígeno singlete, un

fuerte oxidante que provocaría la destrucción, no sólo de la célula marcada, sino también de las que se encuentren próximas.

Otras aplicaciones

Algunos de los derivados fluorescentes de paclitaxel y docetaxel descritos en esta patente poseen una propiedad excepcional: traspasan con facilidad la membrana celular externa y se unen de forma permanente a los microtúbulos del citoesqueleto celular conservando la intensa fluorescencia. Esto hace que sea posible utilizar estos derivados específicos de paclitaxel y docetaxel en concentraciones muy bajas, por debajo de micromolares. Los inventores de esta patente han descubierto que en estas condiciones los microtúbulos del citoesqueleto celular y cualquier estructura celular conteniendo tubulinas (x y ¡¯3 (cilios, flagelos, etc.) permanecen estructural y funcionalmente intactos, pese a que son perfectamente observables a través de la intensa emisión de fluorescencia del derivado de paclitaxel o docetaxel que se encuentra unido específicamente a dichas estructuras

Esto hace posible que la célula o el organismo celular siga ¯esarrollan¯o todas sus funciones biológicas sin alteración (crecimiento, reproducción, metabolismo, movilidad, etc.). Como, simultáneamente, la parte fluorescente del derivado mantiene la intensa luminosidad, este método permite observar y caracterizar la célula u organismo mediante técnicas de detección y visualización de la intensidad de la luz emitida.

En esta forma, los derivados fluorescentes citados de paclitaxel y docetaxel se pueden utilizar como nuevos colorantes específicos celulares de fluorescencia, de uso simple y directo, apropiados para la tinción de una gran variedad de células y organismos sin alterar su viabilidad.

A título ilustrativo, y sin que sea considerado como limitación al alcance de la presente patente, se indica que se ha aplicado el derivado paclitaxel-alanina-fluoresceína en la tinción fluorescente de microtúbulos en células vivas, epiteliales y de tejido nervioso, así como en la tinción de organismos unicelulares vivos,

como el *Trypanosoma cruci*. Hay que destacar que actualmente no existe ningún método comercialmente disponible para la tinción fluorescente de los microtúbulos del citoesqueleto que permita observar las células u organismos *in vivo*, es decir, sin alterar sus funciones vitales.

Esta novedosa y excepcional propiedad de los derivados fluorescentes de paclitaxel y docetaxel es el fundamento de las siguientes aplicaciones:

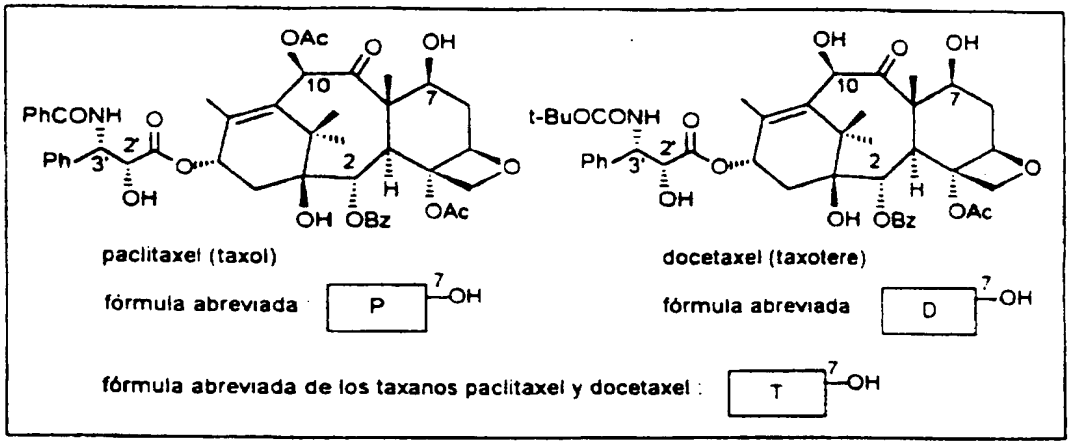
a) nuevos métodos de análisis y diagnóstico de enfermedades relacionadas con organismos celulares dotados de cilios y/o flagelos, fácilmente identificables a través de la observación y detección de sus sistemas característicos de microtúbulos y de su evolución temporal;

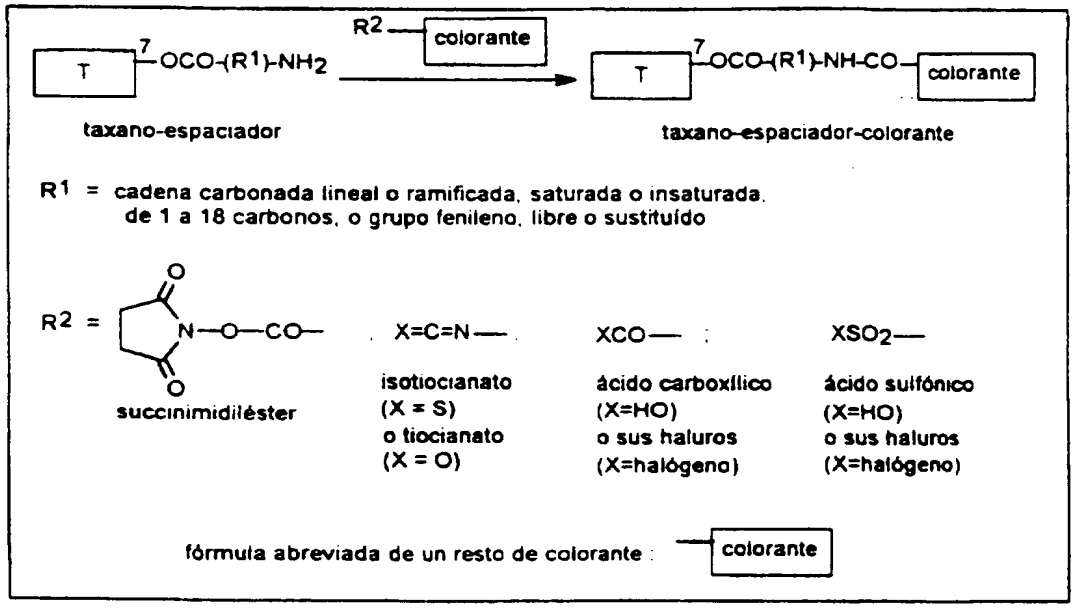
b) nuevos métodos, de análisis y diagnóstico de enfermedades en las que se producen alteraciones o destrucción del sistema y tejidos nerviosos, fácilmente identificables a través de la observación y detección de los sistemas característicos de microtúbulos;

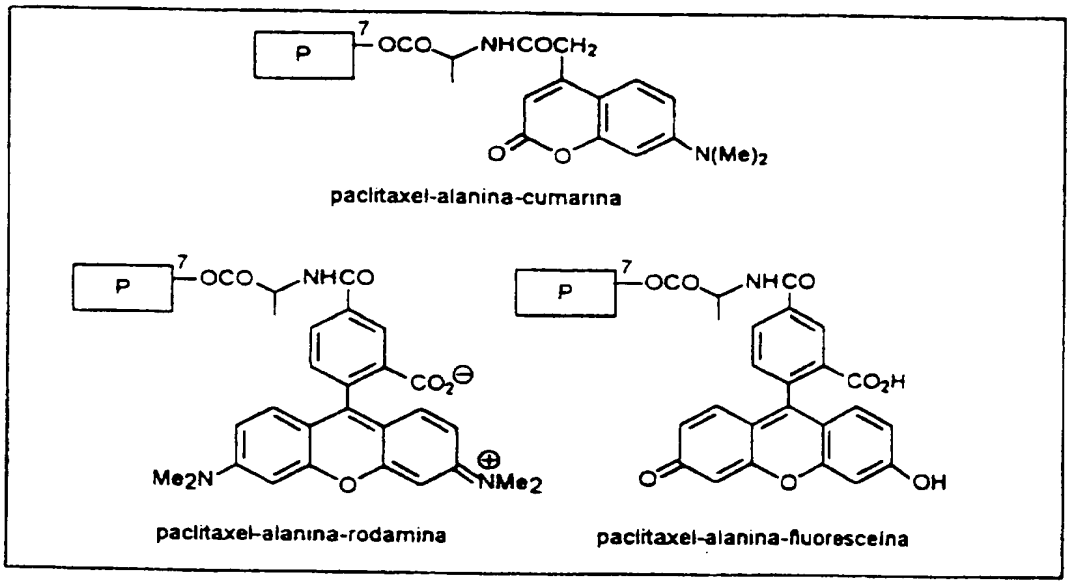
c) nuevos métodos de estudio, clasificación, observación y seguimiento de cualquier célula u organismo celular que contenga microtúbulos o tubulinas α y β.

5. Descripción del esquema

El esquema muestra las estructuras moleculares de paclitaxel y docetaxel, las correspondientes moléculas conteniendo el espaciador $-CO-R^1-NH_2$ en la posición 7, y la estructura resultante de unir un colorante genérico, R^2–colorante, por reacción con el grupo NH_2 del espaciador, así como los posibles grupos R^2 con reacción selectiva con grupos aminos primarios. La parte inferior del esquema muestra las estructuras de los tres derivados de paclitaxel que sirven de ejemplo en esta invención, con el cromóforo de una cumarina, una rodamina o fluoresceína en la molécula.


paclitaxel (taxol)
docetaxel (taxotere)
fórmula abreviada
P
D
T
fórmula abreviada de los taxanos paclitaxel y docetaxel :


colorante
taxano-espaciador
taxano-espaciador-colorante
R1 = cadena carbonada lineal o ramificada, saturada o insaturada, de 1 a 18 carbonos, o grupo fenileno, libre o sustituido
R2 =
succinimidiléster
X=C=N—
isotiocianato (X = S) o tiocianato (X = O)
XCO—
ácido carboxílico (X=HO) o sus haluros (X=halógeno)
XSO2—
ácido sulfónico (X=HO) o sus haluros (X=halógeno)
fórmula abreviada de un resto de colorante :



6. Ejemplos de realización

A título ilustrativo, y sin que sea considerado como limitación al alcance de la presente patente, a continuación se ilustran ejemplos de la unión química de tres colorantes, una cumarina, una rodamina y un xanteno, a la posición 7 de la molécula de paclitaxel, a través de un espaciador de L-alanina, así como un ejemplo práctico del empleo de uno de ellos, el derivado con el grupo fluoresceína, para la visualización de los microtúbulos celulares. Se han elegido estos tres fluoróforos porque muestran propiedades químicas, espectroscópicas y fotofísicas que son óptimas para los fines perseguidos en la presente invención: altos coeficientes de absorción a longitudes de onda alejadas de la absorción intrínseca de las proteínas, y próximas a los máximos de emisión de los láseres

comerciales disponibles, así como altos rendimientos en la emisión de fluorescencia, y valor elevado de la polarización de la emisión (anisotropía).

Ejemplo 1: *Obtención de paclitaxel-alanina-cumarina* (ver fórmula)

A una disolución de 7-(L-alanil)paclitaxel sin purificar (10 mg, 10.8 mmol) (obtenido a partir de paclitaxel, con un rendimiento total del 70 %, siguiendo básicamente el procedimiento descrito por Mathew y cols., *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 145), y trietilamina (15 μL, 108 μmol) en dioxano (1 mL) se añade otra de 7-dimetilaminocumarin-4-acetato de succinimidilo comercial (5.6 mg, 16.2 μmol) en dioxano (0.5 mL). Tras agitar durante 24 horas a temperatura ambiente en la oscuridad, el disolvente se elimina a vacío. El producto crudo paclitaxel-alanina-cumarina se purifica por cromatografía en capa fina preparativa (gel de sílice, acetato de etilo-diclorometano 1:1 como eluyente). Rendimiento: 9.5 mg (77 %). Punto de fusión: 182-185ºC. Pureza por cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) > 96 % (columna C-4, desde el 20 al 80 % de acetonitrilo en agua como eluyente). Solubilidad en agua: 1 μM. El producto se identifica por espectrometría de masas con bombardeo de átomo pesado (MS-FAB$^+$) y por resonancia magnética nuclear de protón.

Ejemplo 2: *Obtención de paclitaxel-alanina-rodamina* (ver fórmula)

A una disolución de 7-(L-alanyl)paclitaxel sin purificar (10 mg, 10.8 mmol) (obtenido como se dice antes) en una mezcla de dimetilformamida (1 mL) y tampón acuoso de pH 9 (carbonato/bicarbonato) (1 mL) se añade otra disolución de tetrametilrodamina-4'-carboxilato de succinimidilo comercial (8.6 mg , 16.2 mmol) en la misma mezcla de disolventes (1 mL). Tras agitar 2 horas, se separa el disolvente a vacío, y el producto crudo paclitaxel-alanina-rodamina se purifica por cromatografía en capa fina preparativa (gel de sílice, acetato de etilo-diclorometano 1:4). Rendimiento: 7.9 mg (55 %). Pureza (por HPLC, condiciones como antes) > 92 %. El producto se identifica como antes.

Ejemplo 3: *Obtención de paclitaxel-alanina-fluoresceína* (ver fórmula)

Siguiendo las mismas condiciones, proporciones y método de purificación que en el caso de la obtención del derivado paclitaxel-alanina-rodamina, se obtienen 8.0 mg (60 %) de producto. Punto de fusión > 300ºC. Pureza (HPLC) > 92 %. Solubilidad en agua: 300 μM (solubilidad de paclitaxel en el mismo medio:

5 μM, según Nicolaou y cols., *Nature* **1993**, *364*, 464). El producto se identifica como antes.

Ejemplo 4: *Observación mediante microscopía de fluorescencia de los microtúbulos celulares con ayuda del colorante vital paclitaxel-alanina-fluoresceína*

Células PtK2 se tratan con el derivado paclitaxel-alanina-fluoresceina (1 μM), se lavan con disolución salina de tampón de fosfato, se montan sin fijación en una disolución de tampón de glicina 0.13 M de pH 8.6, cloruro sódico 0.20 M y glicerina al 70% (de acuerdo con lo descrito por Inés y cols., *Cancer Res.* **1994**, *54*, 75), y se observan con un microscopio de epi-fluorescencia. Los microtúbulos citoplásmicos son perfectamente visibles, así como los husos en las células en proceso de división. La calidad de la imagen es al menos semejante a la que se obtiene mediante procedimientos habituales de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos anti-tubulina sobre células fijadas, distinguiéndose microtúbulos individuales.

7. Reivindicaciones

1 - **Derivados fluorescentes de paclitaxel y docetaxel con actividad antineoplásica, método para obtenerlos y sus aplicaciones**. Estos derivados se caracterizan porque contienen en su molécula un grupo cromofórico luminiscente unido a la molécula original del taxano por la posición 7 a través de un espaciador.

2 - Derivados fluorescentes de paclitaxel y docetaxel con actividad antineoplásica, método para obtenerlos y sus aplicaciones, según la reivindicación 1, caracterizados porque el método para obtenerlos posee dos etapas consecutivas. En la primera etapa el grupo alcohólico en la posición 7 del taxano se esterifica selectivamente con un ácido carboxílico que tiene en su molécula un grupo amino primario. En la segunda etapa se hace reaccionar el aminoderivado del taxano, obtenido en la primera etapa, con un colorante que posee en su molécula un grupo con reacción selectiva con grupos aminos primarios. Los grupos amino primario y ácido carboxílico en el aminoácido están separados por una cadena de 1 a 18 carbonos, lineal o ramificada, o por un grupo fenileno, con o sin sustituyentes alquílicos. Dicho aminoácido puede ser cualquiera de los α-L-aminoácidos naturales conocidos, como glicina, alanina, prolina, etc, sus D-isómeros, las mezclas racémicas correspondientes, o cualquier compuesto que posea simultáneamente en su molécula los grupos ácido carboxílico y amino primario. El grupo con reacción selectiva con grupos aminos primarios puede ser isocianato, isotiocianato, succinimidiléster, ácido carboxílico o haluro de ácido carboxílico, y ácido sulfónico o haluro de ácido sulfónico. El colorante con el anterior grupo reactivo de aminas primarias es siempre un derivado de otro colorante, elegido entre los de las familias de los colorantes xanténicos (fluoresceína, Floxina, Eosina, Eritrosina, Rosa de Bengala), las tiacinas (tionina, Azul de Metileno, Azure A, Azure B), las rodaminas (Rodamina B, Rodamina 3B, Rodamina 19, Rodamina 6G, Rodamina 101, Rodamina 123, Rojo Texas), cumarinas, porfirinas, aminonaftalenos, hidrocarburos aromáticos policíclicos (naftaleno, antraceno, fenantreno, pireno), polienos lineales o ramificados con un mínimo de tres dobles enlaces conjugados, y complejos de pirrometenos con trifluoruro de boro.

3 – Derivados fluorescentes de paclitaxel y docetaxel con actividad antineoplásica, método para obtenerlos y sus aplicaciones, según la reivindicación 1, caracterizados porque poseen bioactividad similar y más alta solubilidad en agua que el taxano del que derivan.

4 – Derivados fluorescentes de paclitaxel y docetaxel con actividad antineoplásica, método para obtenerlos y sus aplicaciones, según la reivindicación 1, caracterizados porque emiten fluorescencia o fosforescencia, o porque generan especies químicas citotóxicas al ser iluminados, cuando se encuentran unidos al sistema de microtúbulos de células benignas o malignas.

5 – Derivados fluorescentes de paclitaxel y docetaxel con actividad antineoplásica, método para obtenerlos y sus aplicaciones, según la reivindicación 1, caracterizados porque las propiedades electrónicas del grupo cromóforo existente en su molécula son adecuadas para nuevos métodos de análisis y nuevas técnicas de diagnóstico de enfermedades cancerosas, así como para la terapia fotodinámica anticancerosa.

6 – Derivados fluorescentes de paclitaxel y docetaxel con actividad antineoplásica, método para obtenerlos y sus aplicaciones, según la reivindicación 1, caracterizados porque las propiedades del grupo cromóforo existente en su molécula son adecuadas para su aplicación, mediante técnicas ópticas de fluorescencia, en la observación, clasificación y seguimiento de células u organismos celulares vivos, sin alteración de sus funciones biológicas, mediante la tinción específica fluorescente de su citoesqueleto, flagelos, cilios, u otras estructuras que contienen, o están microtúbulos.

7. Derivados fluorescentes de paclitaxel y docetaxel con actividad antineoplásica, método para obtenerlos y sus aplicaciones, reivindicación 1, caracterizados porque sus propiedades químicas y fluorescentes son adecuadas para nuevos métodos de análisis y diagnóstico de enfermedades producidas por microorganismos unicelulares, por alteraciones del tejido nervioso y, en general, por cualquier proceso físico, químico y/o biológico que pueda detectarse a través

de la observación específica del sistema de microtúbulos y de sus cambios y transformaciones.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES 96/00231

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC^6: C07D 305/14, C07D 407/12, A61K 49/00, 41/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC^6

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	SOUTO et al: New fluorescent water-soluble taxol derivatives, Angewandte Chemie, International Edition, Vol. 34, nº 23/24, 5 January 1996, pages 2710-2712 ---	1-7
A	MATHEW et al: Synthesis and evaluation of some water-soluble produgs and derivatives of taxol with anti-tumoractivity J. Med. Chem. Vol. 35, nº 1, 10 January 1992, pages 145-151, see page 146; example 10, abstract. ---	1-7
A	SENGUPTA et al: Interaction of a fluorescent Paclitaxel Analogue with Tubulin, Biochemistry, Vol. 34, nº 37, 1995, pag.11889-11894, see page 11890; fig.1; see abstract ---	1-7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
25 February 1997 (25.02.97)	4 March 1997 (04.03.97)
Name and mailing address of the ISA/ S.P.T.O. Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES 96/00231

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP[6] C07D 305/14, C07D 407/12, A61K 49/00, 41/00
De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)

CIP[6]

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
P,X	SOUTO et al: New fluorescent water-soluble taxol derivatives, Angewandte Chemie, International Edition, Vol. 34, nº 23/24, 05.01.96, páginas 2710-2712	1-7
A	MATHEW et al: Synthesis and evaluation of some water-soluble produgs and derivatives of taxol with antitumoractivity J. Med. Chem. Vol. 35, nº 1, 10.01.92, páginas 145-151 Ver página 146; ejemplo 10; resumen	1-7
A	SENGUPTA et al: Interaction of a fluorescent Paclitaxel Analogue with Tubulin, Biochemistry, Vol. 34, nº 37, 1995, pág. 11889-11894, ver página 11890; fig. 1; ver resumen	1-7

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" documentos anterior aunque publicado en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad, que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, resultando dicha combinación evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido la búsqueda internacional.	Fecha de expedición del Informe de Búsqueda Internacional
25 Febrero 1997 (25.02.97)	04 Marzo 1997 (04.03.97)
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la Búsqueda Internacional O.E.P.M. C/Panamá 1, 28071 Madrid, España. nº de fax +34 1 3495304	Funcionario autorizado MARTA OJANGUREN nº de teléfono +34 1 3495474

Formulario PCT/ISA/210 (segunda hoja) (julio 1992)

This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☑ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.
As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.